

氏名（本籍）	かず い み ほ 數 井 美 穂（神奈川県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第 353 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	チエノピリジン系抗血小板薬の代謝活性化に関する研究

論文審査委員	（主査）教授 青山 隆夫
	教授 鍛冶 利幸      教授 岡 淳一郎
	教授 花輪 剛久      教授 山下 親正

## 論文内容の要旨

心疾患は日本人の死因の中で戦後大幅に増加した疾病の 1 つである。厚生労働省「平成 26 年人口動態統計の年間推計」では、心疾患は悪性新生物に次いで第 2 位の死因と記載されている。近年、心疾患総患者数は増加傾向にあり、平成 23 年と比較して平成 26 年では約 10 万人増加している。なかでも急性心筋梗塞・不安定狭心症は死亡率が高く、緊急の治療を要する疾患とされている。急性心筋梗塞と不安定狭心症はあわせて急性冠症候群（ACS）と呼ばれており、冠状動脈中の動脈硬化性プラークが破壊されることにより冠動脈の狭窄した部位に血栓が形成され血流の著しい低下、さらには血管の閉塞を引き起こし、心筋壊死に至る疾患である。ACS 疾患の一般的治療法としては外科的治療法として冠動脈バイパス術と心臓カテーテル治療、いわゆる経皮的冠動脈形成術（PCI）があり、内科的治療法としては薬物療法がある。冠動脈バイパス術の利点としては血流の回復に有効であり、PCI が適応できない患者にも有効であるが、血塊による心臓発作、不整脈、腎不全、脳卒中等の合併症のリスクがあり、大手術のため体への負担が大きいという欠点がある。一方、PCI の利点としては速やかに血流が改善され、重大な合併症が生じるリスクは低く、心臓への損傷が最小限であるため、体への負担は小さい。しかし、欠点としてステント周辺に血栓が形成され、血管

が再開塞されるというリスクがある。このステント内血栓による致死率は約20%である。

従って、PCIのステント留置後の一定期間はステント血栓症発生率を抑制する目的で、抗血小板薬2剤併用療法（アスピリン／チエノピリジン系抗血小板薬）が推奨されている（安定冠動脈疾患における待機的PCIのガイドライン（2011年改訂版）より）。

現在、PCIが適用される虚血性心疾患（ACS、安定狭心症、陳旧性心筋梗塞）の治療薬として市販されているチエノピリジン系抗血小板薬にはチクロピジン（第一世代）、クロピドグレル（第二世代）、プラスグレル（第三世代）がある。1981年に日本で承認されたチクロピジンの臨床用量は200-600 mg/dayと高く、重篤な副作用（肝障害、血栓性血小板減少性紫斑病など）が問題となっていた。1997年に米国で上市され、2006年に日本で承認された第二世代のクロピドグレルはこのような副作用発症頻度が軽減されており、臨床用量もチクロピジンと比較して初回用量300 mg/day、維持用量75 mg/dayと低い用量で有効な血小板凝集抑制作用を発揮する。現在、クロピドグレルの売上は国内トップクラスであり、非常に多くのACS疾患患者に服用されている。しかし、クロピドグレルに対する“non-responders”あるいは“variable response”の症例も多数認められている。2009年に欧州・米国で承認され、2014年に日本でも承認された第三世代のプラスグレルはこれら先行品の欠点を克服するべく開発された薬物であり、臨床において安全性と有用性が確認されている。プラスグレルの臨床用量はクロピドグレルよりさらに低く、初回用量20 mg/day、維持用量3.75 mg/dayで有効な血小板凝集抑制作用を示す。

一連のチエノピリジン系抗血小板薬はそれ自身では血小板凝集抑制作用を持たないプロドラックであり、生体内で活性代謝物に変換された後、血小板膜上のP2Y<sub>12</sub>受容体と共有結合し、強力な血小板凝集抑制作用を示す。In vitroにおける血小板凝集抑制作用はチクロピリジン活性代謝物が最も低く、プラスグレルとクロピドグレルの各活性代謝物は同程度の血小板凝集抑制作用を示す。しかし、臨床（in vivo）における薬効発現用量はプラスグレルが最も低く、次いでクロピドグレル、チクロピジンの順である。プラスグレルの血小板凝集抑制作用はクロピドグレルと比較して「低用量で確実な薬効」を示し、且つ、「個体間変動」も小さい。また、プラスグレルの薬効発現はクロピドグレルと比較して「迅速」である。

このような in vitro と in vivo の乖離から、プラスグレルはクロピドグレルと比

較して効率良く、活性代謝物を生成していることが示唆された。著者は以上のような臨床結果を踏まえ、プラスグレルがクロピドグレルと比較して、「低用量で薬効発現し、その効果は迅速かつ確実に個人間変動が少ない薬物」であるという薬理的優位性の要因を明らかにするため、薬物動態的視点からプラスグレルとクロピドグレルの代謝活性化に注目して研究した。

本論文は三章で構成し、先ずクロピドグレルの個人間変動の要因を明らかにした。その後、続く2つの章でプラスグレルの「低用量で薬効発現し、その効果が迅速かつ確実に」である要因を明らかにし、さらにそれに関わる代謝活性化反応や関連酵素について検討した。

第1章の「クロピドグレル代謝物生成に関与する CYP 同定とその寄与率に関する研究」では、クロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体 (2-oxo clopidogrel) 生成に関与する CYP 分子種が CYP1A2, 2B6, 2C19 であることを同定した。クロピドグレルは加水分解反応により、そのほとんどがクロピドグレル酸化体 (不活性代謝物) へ代謝される。著者はさらなる試験において、このクロピドグレル酸化体に代謝されなかったクロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体生成に関与するこれら CYP 分子種の代謝寄与率がそれぞれ 35.8%, 19.4% および 44.9% であることを示した。また、クロピドグレルチオラクトン体から活性代謝物生成に関与する CYP 分子種が CYP2B6, 2C9, 2C19 および 3A4 であることを明らかにし、これら CYP 分子種の寄与率はそれぞれ 32.9%, 6.76%, 20.6% および 39.8% であることを示した。クロピドグレルは2段階の酸化反応を経由して活性代謝物を生成する。この2段階の両酸化過程に CYP2C19 が大きく寄与していることがクロピドグレルの個人間変動の要因の一つと考察される。実際、CYP2C19 の代謝活性がほとんどない個人群 (poor metabolizer; PM)、活性が低下している個人群 (intermediate metabolizer; IM)、活性が高い個人群 (Extensive metabolizer; EM) にクロピドグレルを経口投与し、血漿中活性代謝物濃度と血小板凝集抑制作用の関連性を評価した臨床試験では、CYP2C19 PM 群で活性代謝物生成ならびに血小板凝集抑制作用が低いという報告がされている。本研究は「CYP2C19 遺伝子多型と薬効の個人間変動の関連性」に関する臨床試験を起案する上で有用な研究結果である。

また、クロピドグレル添付文書に「CYP2C19 遺伝子多型の影響」に関する注意喚起を記載する発端となった研究であり、医療現場での適正使用に貢献した研究である。

第2章の「プラスグレルの加水分解反応に関与する新規ヒト小腸中 RKIP (Raf

kinase inhibitor protein)の同定研究」では、著者はサル小腸サイトソルからプラスグレルの初発代謝物であるチオラクトン体の生成活性を指標として、新規加水分解酵素を単離精製することに成功し、本酵素が RKIP であることを明らかにした。本研究は RKIP が加水分解代謝活性を持つことを初めて明らかにした研究であり、薬物代謝学への貢献につながる研究である。さらに、ヒト小腸 S9 を用いた試験では、小腸 S9 中でのプラスグレル加水分解反応に関与する hCE2 (ヒトカルボキシエステラーゼ 2) と RKIP の寄与率がそれぞれ約 60% および 30-40% であることを示した。プラスグレルは小腸中でそのほとんどが加水分解反応によりチオラクトン体に代謝され、その後、酸化反応により活性代謝物を生成する。hCE2 は小腸ミクロソーム中に主に発現している加水分解酵素としてよく知られている。著者らは hCE2 によるチオラクトン体生成活性はプラスグレル濃度 109  $\mu\text{M}$  以上になると低下することを報告している。この濃度(109  $\mu\text{M}$ )は 250 mL の水でプラスグレル 10 mg を服薬した際の濃度にほぼ匹敵する。臨床試験では、プラスグレルを 2.5 mg、10 mg、75 mg の用量で服薬した際のチオラクトン体の血漿中濃度は線形であった。In vitro の結果を考慮するとプラスグレル加水分解反応に関与する酵素が hCE2 だけでは、チオラクトン体血漿中濃度が用量 75 mg まで線形であることを説明できない。しかし、この in vitro と in vivo の乖離は RKIP という加水分解酵素が小腸に存在することを明らかにすることにより説明可能となった。つまり、本研究において、RKIP という新規加水分解酵素の存在を見出したことがプラスグレルの薬効発現が早く、且つ確実であるという臨床上の薬理的優位性を説明する上で重要な成果である。

第 3 章の「プラスグレルの S-メチル化酵素の同定とその立体選択的代謝反応に関する研究」では、筆者は活性代謝物消失反応である S-メチル化反応に注目し、in vitro と in vivo の両面から評価した。In vitro 評価では S-メチル化反応がチオール S-メチルトランスフェラーゼ (TMT) によって触媒され、本酵素の反応に立体選択性があることを明らかにした。

プラスグレル活性代謝物は構造中に 2 箇所不斉中心を持つため、4 種光学異性体の混合物である。これら 4 種光学異性体の in vitro 活性はそれぞれ異なり、活性が弱い 2 種異性体のみ TMT による S-メチル化反応を受けることを明らかにした。In vivo 評価では、ラットおよびイヌに活性代謝物を静脈内投与し、S-メチル代謝物立体異性体の血漿中濃度を測定した。いずれの動物種でも血漿中の S-メチル代謝物立体異性体の曝露は活性の弱い 2 種異性体から生成する S-メチル代謝物が大部分であった。本結果は in vitro で得られた TMT の酵素特性を反映して

おり、*in vivo*においても TMT の代謝立体選択性が機能していることを明らかにした。実際、ラット、イヌ、ヒト血漿中 4 種光学異性体活性代謝物の存在比は活性の強い 2 種光学異性体が活性の弱い 2 種光学異性よりも優位に血漿中に存在しており、本現象は TMT の立体選択性に起因すると考えられる。「TMT の代謝立体選択性」という酵素特性を本研究で明確にしたことはプラスグレルの薬効発現が低用量で確実である要因を説明する上で意味のある研究成果と言える。

以上、プラスグレルとクロピドグレルの代謝活性化、特に活性代謝物生成過程・消失過程の効率的代謝活性化に注目した研究は、臨床上、プラスグレルがクロピドグレルと比較して、「低用量で薬効発現し、その効果は迅速かつ確実で個体間変動が少ない薬物」であるという薬理学的優位性を説明する上で重要である。本研究成果はすでに市販されている両薬剤の適正使用に貢献している。さらに、こうした新規薬物代謝酵素の発見、既知薬物酵素の新たな基質特異性の発見は今後の薬物代謝学の拡充、さらには、プロドラッグの創薬に貢献できると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

近年、心疾患総患者数は増加傾向にあり、なかでも急性心筋梗塞、不安定狭心症は死亡率が高く、緊急の治療を要する疾患とされている。これらに対する一般的治療法として、内服療法の外、外科的治療法として冠動脈バイパス術と心臓カテーテル治療、いわゆる経皮的冠動脈形成術（PCI）がある。特に、PCI は「重大な合併症が生じるリスクは低い」などの臨床上の利点から施術例も多いが、一方でステント周辺に血栓が形成され、血管が再開塞されるというリスクもある。この血栓症発生率を抑制する目的で、アスピリンのほかチエノピリジン系抗血小板薬の使用が推奨され、長くクロピドグレルが使われてきた。しかし、クロピドグレルにはいくつか欠点もあり、それらを克服した薬剤として、プラスグレルが上市された。プラスグレルの血小板凝集抑制作用はクロピドグレルと比較して「低用量で確実な薬効」を示し、「個体間変動」も小さく、また薬効発現は「迅速」である。

本論文は、上述したクロピドグレルに対するプラスグレルの薬理学的優位性の要因を明らかにするため、薬物動態的視点から両薬物の代謝活性化に注目し、その研究成果を、以下の 3 章にまとめたものである。

第 1 章では、クロピドグレル代謝物生成に関与する CYP 同定とその寄与率を明らかにした。クロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP 分子種は CYP1A2, 2B6, 2C19 であり、それぞれの代謝寄与率が 35.8%, 19.4% および 44.9% である

ことを明らかにした。さらに、クロピドグレルチオラクトン体から薬理活性代謝物生成に関与する CYP 分子種は CYP2B6, 2C9, 2C19 および 3A4 であり、それぞれの寄与率が 32.9%, 6.76%, 20.6% および 39.8% であることを明らかにした。クロピドグレルは 2 段階の酸化反応を経て活性代謝物を生成し、両酸化過程に CYP2C19 が大きく寄与していることがクロピドグレルの個体間変動の要因の一つと考察される。実際、CYP2C19 の代謝活性がほとんどない個体群 (poor metabolizer; PM) で活性代謝物生成ならびに血小板凝集抑制作用が低いと報告されている。

第 2 章では、プラスグレルの加水分解反応に関与する新規ヒト小腸中酵素 RKIP (Raf kinase inhibitor protein) をサル小腸サイトソルから単離精製することに成功した。さらに、ヒト小腸 S9 を用いた試験では、小腸 S9 中でのプラスグレル加水分解反応に関与する hCE2 (human carboxylesterase 2) と RKIP の寄与率がそれぞれ約 60% および 30-40% であることを示した。プラスグレルは小腸中でそのほとんどが加水分解反応によりチオラクトン体に代謝され、その後、酸化反応により活性代謝物を生成する。臨床試験では、プラスグレルを 2.5 mg、10 mg、75 mg の用量で服薬した際のチオラクトン体の血漿中濃度は線形であるが、このことはプラスグレル加水分解反応に両酵素が関与することで、初めて説明可能となった。本結果は、プラスグレルの薬効発現が迅速で、且つ確実であるという臨床上の薬理学的優位性の根拠となっている。

第 3 章では、プラスグレルの活性代謝物消失反応である S-メチル化反応に関与する S-メチル化酵素の同定とその立体選択的代謝反応について検討した。S-メチル化反応は TMT (thiol methyltransferase) によって触媒され、本酵素の反応に立体選択性があることを明らかにした。活性代謝物は構造中に 2 箇所不斉中心を持つため、4 種光学異性体の混合物である。これら 4 種光学異性体の薬理活性はそれぞれ異なり、活性が弱い 2 種の異性体のみ TMT による S-メチル化反応を受けることを明らかにした。実際、ラット、イヌ、ヒト血漿中でも活性の強い 2 種の光学異性体が優位に存在しており、プラスグレルの薬効発現が低用量でも確実である理由を説明する上で意味のある研究成果となった。

以上、本論文での研究を通し、プラスグレルとクロピドグレルの代謝活性化、特に薬理活性代謝物の生成および消失過程の効率的代謝反応に注目した研究は、临床上、プラスグレルがクロピドグレルと比較して、薬理学的優位性を説明する上で重要であり、すでに上市されている両薬物の適正使用に貢献している。また、今回得られた薬物動態学に関する重要な知見を今後創薬の現場にフィードバックすることにより、臨床的価値の高い医薬品の創製に大きく寄与できるものと考えられる。

本論文は、医薬品の開発、特に新製剤の戦略的開発を薬物動態的側面から支持する研究の好例として有意義な研究成果であり、著者に博士 (薬学) の学位を与えるのに十分な価値を有すると判断する。